

I. 再構成されたT細胞レセプター 鎖遺伝子を有する前T細胞株(THP-6)の性状 II. ヒトT細胞腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体

著者	峯岸 正好
号	2028
発行年	1988
学位授与番号	医第2028号
URL	http://hdl.handle.net/10097/20229

論 文 内 容 要 旨

ヒト白血病細胞を *in vitro* での増殖に適応させ、長期継代培養可能な株細胞として樹立していくことは、白血病の細胞生物学的研究のみならず、血液細胞の分化・成熟過程を研究する上でも貴重な材料を提供してくれる。そのような試みのなかから私が樹立し THP-6 と名づけた細胞株について報告する。この論文は二つに別れており、先ず最初に null 型白血病細胞株とされていた THP-6 が恐らくは文献上最初に明記された Precursor T 細胞株であることを説明する。次いでこの Precursor T 細胞株 THP-6 を免疫原として、培養 T 細胞株および一部の T 細胞腫瘍と特異的に反応するモノクローナル抗体を作製したので、この抗体の性状について論述する。

症例は急性リンパ性白血病 (ALL) の 6 才女児で、入院時の検索により null 細胞 (ALL) と診断した。初発時の患者骨髓血より Ficoll-Paque 比重遠心法で単核球を分離し、20% 胎児牛血清 (FCS) 加 RPMI 1640 培地に浮遊し、96 穴マイクロプレートを用い、37°C、5% CO₂ インキュベーター中で培養し適宜培地を交換した。樹立された白血病細胞株 THP-6 の形態は French-American-British 分類上 L2 に相当するものと思われた。羊赤血球に対するレセプター、C₃b 及び C₃d 補体レセプター、IgG 及び IgM-Fc レセプターはいずれも保有していなかった。間接蛍光抗体法により Ortho 社 Spectrum-III にて行なった表面マーカー分析では CD 7 (+) CD 5 (+) CD 2 (-) CD (-) であり、成熟 T 細胞、B 細胞、骨髓単球系抗原は陰性であった。TdT 抗原分析の結果は陽性であったが、細胞質内 CD 3 抗原や EB ウイルス関連核内抗原 EBNA は陰性であった。次に細胞より抽出した高分子 DNA を制限酵素 Eco R1 で切断し、サザンブロッティング次いで ニックトランスレーションで標識した C_β プローブおよび J_H プローブを用いてハイブリダイズさせた後、オートラジオグラフィにて遺伝子再構成の有無を検索したところ、THP-6 では T 細胞レセプター β 鎖遺伝子の再構成が認められたのに対し、免疫グロブリン H 鎖遺伝子の再構成は認められなかった。以上より THP-6 は immature thymocyte の表現型及び再構成された T 細胞レセプター β 鎖遺伝子を有する T 細胞株であると考えられる。文献検索上 P30/OKUBO と KE-37 の 2 つの T 細胞株が THP-6 の表現型に近似していたが、いずれも成熟 T 細胞抗原 CD 4 又は CD 8 陽性であった。従ってこのような表現型を持った T 細胞株の報告は THP-6 が初めてだと思われる。

次に THP-6 に特異的なモノクローナル抗体の話に移る。THP-6 由来患者末梢血より EB ウイルスを用いて B 細胞株を樹立しており、従ってこの B 細胞株とは反応せず THP-6 のみと反応する抗体を探すことがモノクローナル抗体作製の基本方針となった。方法は THP-6 で 8 週令の雌の

BALB/cマウスを免疫し、その脾細胞とマウスミエローマ細胞SP-2をポリエチレングリコールで細胞融合させ、96穴マイクロプレート中の培養上清を免疫ロゼット法にてスクリーニングし、陽性ウェル中の細胞を限界希釈法にて4回クローニングしT細胞株とのみ反応するモノクローナル抗体を分泌するハイブリッドクローンをB2Dと命名した。B2D抗体のサブクラスはIgG1であった。B2Dモノクローナル抗体と種々の細胞との反応性は間接蛍光抗体法によりSpectrum-Ⅲを用いて行なった。検索した既知のT細胞株9株中6株が陽性であり、T細胞株以外ではB細胞株であるBALL-1と反応するのみであった。またT細胞白血病/リンパ腫症例4例中3例と反応した。しかし、正常人由来の末梢T細胞、B細胞、単球、顆粒球、血小板、赤血球、骨髓細胞、胸腺細胞、リンパ節細胞およびT細胞腫瘍以外の急性及び慢性白血病細胞とは反応しなかった。正常人末梢血単核球をPhytohemagglutinin (PHA), ConcanavalinA (Con A) 添加にて72時間培養して得られた細胞についても陰性であった。

B2D抗原の分子量はlactoperoxidase法により¹²⁵Iでラベルした細胞のNP-40可溶分画にモノクローナル抗体を添加後、Protein A-Sepharoseを用いた免疫沈降次いでSDS-PAGEを行なうことにより決定した。B2D抗原の分子量は還元状態で50-55 kilodaltonsであった。

以上、Precursor T細胞と考えられるTHP-6を免疫原として得られたモノクローナル抗体B2Dが認識する抗原はT細胞白血病の一部及び株化T細胞表面上に特異的に見いだされる新しい腫瘍特異抗原と考えられるが、その生物学的意味付けは未だ明らかになっていない。しかし今後T細胞白血病の亜分類への応用やその中でB2D抗原を腫瘍細胞表面に発現している症例の残存骨髓腫瘍細胞をin vitroで根絶する手段の一つとしてこのB2D抗体を自家骨髓移植に用い得るのではないかと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文はnull細胞型急性白血病細胞の長期培養可能な細胞株THP-6を樹立し、その細胞学的性状を解析し、特異な表現型をもったT前駆細胞であることを確認すると共に、このTHP-6を免疫原として、モノクローナル抗体(mAb)を作成し、その一つのB2DはT白血病細胞の一部と株化T細胞表面抗原を特異的に認識することを明らかにしている。

THP-6細胞はFAB分類のL2に属し、表面マーカー分析ではCD7⁺、CD5⁺、CD2⁻、CD10⁻であり、その他成熟T細胞、B細胞、骨髄・単球系細胞などの抗原は陰性であった。また、TdT⁺、細胞質CD3⁻、EBV関連抗原陰性であった。このような形質表現から、THP-6はT前駆細胞(未熟胸腺細胞)と考えられた。さらに、T細胞レセプター(TCR)遺伝子のC_βおよび免疫グロブリン(Ig)遺伝子のJ_Hの各プローブを用いて、夫々の遺伝子の再構成の有無について検索した。その結果、THP-6細胞のTCR_βの再構成が認められたが、IgH鎖の再構成が認められなかった。この事実から、THP-6がT細胞株であることが遺伝子レベルでも確認された。THP-6の様な表現型をもったT細胞株は初めての報告と考えられる。

上記の性状をもつユニークなT細胞株THP-6細胞を免疫したマウス脾細胞とマウスミエローマ細胞SP-2の細胞融合にさせ、得られたハイブリドーマの中、THP-6細胞と特異的に反応するものをクローニングして、B2Dクローンを得た。B2Dの産生するmAbのイソタイプはIgG1であった。このmAbと種々の細胞との反応性を間接蛍光抗体法で染色したのち、フローサイトメトリーによって分析した。その結果、既知T細胞株9株のうち6株がB2D陽性で、B細胞や非T細胞株11株のうち1株(BALL-1)を除いて全てB2D陰性であった。また、白血病細胞ではT細胞白血病4例中3例がB2D陽性で、他の白血病12例では全てB2D陰性であった。さらに、正常人由来の末梢T細胞、B細胞、単球、顆粒球、血小板、骨髄系細胞、胸腺細胞、リンパ節細胞、PHAおよびConA刺戟芽球細胞など検索し得た細胞は全てB2D陰性であった。このことから、B2D抗体はT細胞白血病と株化T細胞表面の抗原を特異的に認識することが認定された。¹³¹Iラベル膜蛋白の免疫沈降反応により、mAbB2Dの認識する抗原の分子量は50-55KDの蛋白であることが確認された。まだ、この抗原蛋白の機能は不明であるが、これを認識するmAbB2Dの腫瘍化T細胞特異性はその診断のみならず、白血病の本態解析や治療への応用にも活用されるものと期待される。

よって、本論文は学位授与に値する。